製品コード 6167

研究用

TaKaRa

Provirus Copy Number Detection Primer Set, Human (for Real Time PCR)

説明書

v201210Da

I. 製品説明

Provirus Copy Number Detection Primer Set, Human（for Real Time PCR）は、リアルタイム PCR を利用して MLV（murine leukemia virus：マウス白血病ウイルス）ベースのレトロウイルスベクターでヒト正常細胞＊1 へ遺伝子導入した際のプロウイルスコピー数を測定するためのセットです。プロウイルスとは、レトロウイルスのゲノムが宿主細胞のゲノムに組み込まれた状態です。細胞内でレトロウイルスゲノムは宿主の DNA 遺伝子に組み込まれてプロウイルスとなります。
本セットを CycleavePCR Core Kit（製品コード CY501）と組み合わせて使用することで、遺伝子導入したヒト正常細胞のゲノム DNA からプロウイルスコピー数を測定する事が可能です。また、MLV のパッケージングシグナル部分を増幅対象にしていますので、ほぼすべての MLV ベースのレトロウイルスベクターで遺伝子導入したヒト正常細胞のプロウイルスコピー数を測定することができます。
プロウイルスコピー数を測定する方法として、遺伝子導入した細胞をクローン化し、サザンブロッティングにより測定して、平均プロウイルスコピー数を算出する方法が考えられますが、平均プロウイルスコピー数を算出するためには多くのクローンを取得してサザンブロッティングを行う必要があり、非常な労力と時間を要することが予測されます。本セットを用いることで細胞をクローン化することなく簡単に平均プロウイルスコピー数を算出する事が可能です。
併用する CycleavePCR Core Kit は、迅速性と定量性に優れたリアルタイム PCR 法と非常に特異性の高い検出法であるサイクリーブプローブ法＊2 を組み合わせたもので、ターゲットの定量をゲノム DNA のバックグラウンドを抑えて正確かつ簡便に行うことができます。

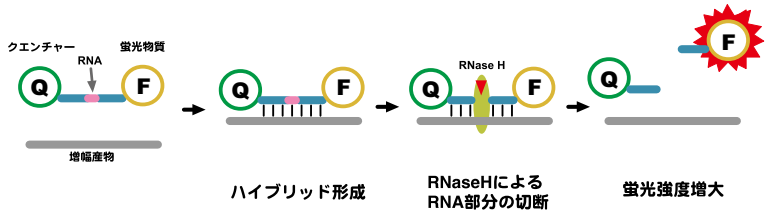
＊1：注意

本セットは遺伝子導入したヒト細胞用です。他の細胞には使用できません。
また、正常細胞など、常染色体が 2 倍体のものに限ります。癌細胞や培養細胞など、常染色体数が 2 倍体でないものに関しては、VI. 6 を参照してください。

ウイルスベクターの感染直後に本セットを用いて測定した場合、プロウイルスだけではなく組み込み前の二本鎖 DNA や環状型 DNA（2LTR、1LTR）も検出する可能性があります。
感染後、時間経過とともに、その影響は少なくなりますので、感染数日後にゲノム DNA を調製し、測定していただくことをお勧めいたします。
また、細胞からのゲノム DNA の調製には、ゲノム DNA が優先的に抽出されるゲノム DNA 抽出キット（NucleoSpin® Tissue など）をご使用ください。

＊2：サイクリーブプローブ法

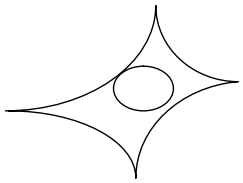
サイクリーブプローブ法は、RNA と DNA からなるキメラプローブと RNase H の組み合わせによる高感度な検出法で、増幅中や増幅後の遺伝子断片の特定配列を効率良く検出することができます。その検出原理を以下の図に示します。



サイクリーブプローブ法の原理

プローブは、RNA 部を挟んで一方に蛍光物質が、他方にその蛍光物質の発する蛍光を消光する物質（クエンチャー）が標識されています。このプローブは、インタクトな状態ではクエンチングにより強い蛍光を発することはありませんが、増幅産物中の相補的な配列とハイブリッドを形成した後に RNase H により RNA 部分で切断されて、強い蛍光を発するようになります。この蛍光強度を測定することで、増幅産物量をモニターすることができます。
プローブの RNA 部分がミスマッチであれば RNase H により切断されることはないので、一塩基の違いも識別できる特異性の高い検出方法です。

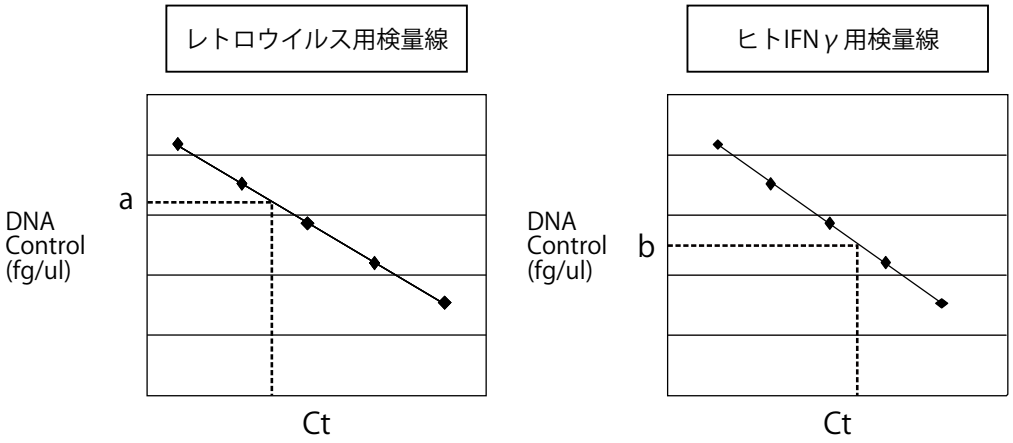
本セットを用いたプロウイルスコピー数測定方法の原理



レトロウイルスベクターによる
遺伝子導入細胞

ゲノム DNA 抽出

Real time PCR（サイクリーブプローブ法）による、レトロウイルスとヒト IFN γ の定量



プロウイルスコピー数 = (a/b) × 2

レトロウイルスとヒト IFNγ（インターフェロンγ）それぞれの最適領域が 1 コピークローニングされた DNA control を用いて 2 種類（レトロウイルスとヒト IFNγ）の検量線を作成し、目的サンプルのゲノム DNA 中のレトロウイルスとヒト IFNγ の定量を行う。
ヒト IFNγ の増幅領域はゲノム染色体に 1 コピーなので、ヒト IFNγ に対するレトロウイルスの比率は a/b になり、正常細胞は常染色体が 2 倍体なので、2 を掛けた数字がプロウイルスコピー数となる。

II. セットの内容 （100 反応分；25 μl 反応系）

1. Retrovirus Primer Mix for Provirus, Human（10 pmol/μl each）	50 μl
2. Retrovirus Probe for Provirus, Human（10 pmol/μl）＊	50 μl
3. hIFNγ Primer Mix for Provirus（10 pmol/μl each）	50 μl
4. hIFNγ Probe for Provirus（10 pmol/μl）＊	50 μl
5. DNA Control Template for Provirus, Human（200 pg/μl）	15 μl
6. EASY Dilution（for Real Time PCR）	1 ml × 4

＊：蛍光標識プローブ（FAM）につき遮光に留意すること。

III. 保存

－ 20℃

IV. セット以外に必要な試薬

CycleavePCR Core Kit（製品コード CY501）

V. 操作上の注意

本キットを使用する場合の注意事項です。使用前に必ずお読みください。

（1） 反応液は、まとめて Master Mix（dH_2O、バッファー、酵素等の混液）を調製すると便利です。Master Mix を作ることにより、ピペッティングによるロスや、試薬の分注、撹拌回数が少なくなり、正確な試薬の分注を行うことができます。その結果、実験間のデータのばらつきも防げます。

（2） CycleavePCR Core Kit（製品コード CY501）に含まれる *TaKaRa Ex Taq* HS と Tli RNase H II は、使用前に軽く遠心して、試薬をチューブの底に落としてください。酵素は 50% グリセロール溶液で粘度が高いので、注意深くゆっくりとピペッティングを行ってください。これらの酵素類は使用直前まで－ 20℃で保存し、使用後は直ちに－ 20℃に保存してください。

（3） CycleavePCR Core Kit（製品コード CY501）に含まれる 10 × CycleavePCR Buffer は、融解時に不溶物が見られる場合がありますが、溶解すれば問題ありません。Vortex 等を使用して、完全に溶解してから使用してください。

（4） 試薬の分注を行うときは必ず新しいディスポーザブルチップを用い、サンプル間のコンタミネーションを極力防止してください。

VI. 操作

1. 反応用ゲノム DNA の調製
   1）レトロウイルスベクターで遺伝子導入したヒト正常細胞から、ゲノム DNA を取得する。＊
   2）取得したゲノム DNA を滅菌水で 20 ～ 100 ng/μl に希釈した溶液の必要量をチューブに取り、95℃ , 5 分で熱変性した後、氷上にて急冷する。
      ＊：NucleoSpin® Tissue（製品コード 740952.10/.50/.250）を用いると、簡便かつ迅速に高純度のゲノム DNA を抽出することが可能です。

2. 検量線用サンプルの調製
   本セット付属の DNA Control Template for Provirus, Human を用いてリアルタイム PCR を行い、レトロウイルスとヒト IFNγの検量線を作成し、両検量線からプロウイルスのコピー数を算出します。

   以下の要領に従い、DNA Control Template for Provirus, Human の段階希釈溶液を作製する。
   1）DNA Control Template for Provirus, Human（200 pg/μl）1 μl に EASY Dilution（for Real Time PCR）を 99 μl 加えて 100 倍希釈し、2 pg/μl（約 5.7 × 10^5 copies/μl）となるように調製する（チューブ 1）。
   2）新たなチューブに EASY Dilution（for Real Time PCR）を 45 μl ずつ分注する（チューブ 2 ～ 5）。
   3）よく混合したチューブ 1 から 2 pg/μl の DNA Control Template for Provirus, Human をチューブ 2 に 5 μl 加え、懸濁する。
   4）チューブ 2 から 5 μl をチューブ 3 に加え、懸濁する。
   5）同様の操作を繰り返し、チューブ 5 まで段階希釈する。

チューブ	DNA量(μl)	EASY Dilution (μl)	濃度
1	1	99	2 pg/μl
2	5	45	200 fg/μl
3	5	45	20 fg/μl
4	5	45	2 fg/μl
5	5	45	0.2 fg/μl

   6）95℃ , 5 分で熱変性した後、氷上にて急冷する。

3. リアルタイム PCR 用反応液の調製
（CycleavePCR Core Kit の説明書に従って操作してください。）
レトロウイルス用とヒト IFNγ用それぞれ以下に示す反応液を氷上で調製する。＊1

レトロウイルス用
＜1 反応あたり＞

試薬	使用量	最終濃度
10 × CycleavePCR buffer ＊2	2.5 μl	1 ×
dNTP Mixture（2.5 mM each）＊2	3 μl	0.3 mM
Mg^{2+} solution（25 mM）＊2	5 μl	5 mM
TaKaRa Ex Taq HS（5 U/μl）＊2	0.25 μl	
Tli RNase H II（200U/μl）＊2	0.5 μl	
Retrovirus Primer Mix for Provirus, Human（10 pmol/μl each）	0.5 μl	0.2 μM each
Retrovirus Probe for Provirus, Human（10 pmol/μl）	0.5 μl	0.2 μM each
ゲノム DNA、もしくは検量線作成用サンプル	5 μl	
dH_2O ＊2	7.75 μl	
Total	25 μl	

ヒト IFNγ用
＜1 反応あたり＞

試薬	使用量	最終濃度
10 × CycleavePCR buffer ＊2	2.5 μl	1 ×
dNTP Mixture（2.5 mM each）＊2	3 μl	0.3 mM
Mg^{2+} solution（25 mM）＊2	5 μl	5 mM
TaKaRa Ex Taq HS（5 U/μl）＊2	0.25 μl	
Tli RNase H II（200U/μl）＊2	0.5 μl	
hIFNγ Primer Mix for Provirus（10 pmol/μl each）	0.5 μl	0.2 μM each
hIFNγ Probe for Provirus（10 pmol/μl）	0.5 μl	0.2 μM each
ゲノム DNA、もしくは検量線作成用サンプル	5 μl	
dH_2O ＊2	7.75 μl	
Total	25 μl	

＊1：Thermal Cycler Dice Real Time System *II*（製品コード TP900）を使用する際の条件を示します。他の機器を使用する場合は、各機種の取扱説明書に従って操作してください。
＊2：CycleavePCR Core Kit（製品コード CY501）のコンポーネントです。

4. 反応を開始する。（Thermal Cycler Dice Real Time System II を用いる場合の操作方法）＊
反応チューブまたはプレートを遠心機で軽く遠心後、Thermal Cycler Dice Real Time System II にセットし、反応を開始する。
Thermal Profile Setup 画面で Collect Data のチェックを FAM に入れる。

ステップ		温度	時間	検出
初期変性		95℃	30秒	OFF
PCR反応	変性	95℃	5秒	OFF
	アニーリング	55℃	15秒	OFF
	伸長	72℃	15秒	ON
サイクル数		40 cycles		

＊：ここでは Thermal Cycler Dice Real Time System II（製品コード TP900）を使用する際の条件を示します。他の機器を使用する場合は、各機種の取扱説明書に従って操作してください。

5. 反応終了後、解析を行う。
反応終了後、FAM フィルターで増幅曲線を確認し、検量線を作成して以下の計算方法で披検サンプルのプロウイルスコピー数を算出する。

＜プロウイルスコピー数計算方法＞
レトロウイルス用検量線およびヒト IFNγ用検量線から、サンプルのレトロウイルスとヒト IFNγの濃度を算出

プロウイルスコピー数＝
（サンプルのレトロウイルス濃度／サンプルのヒト IFNγ濃度）× 2＊
＊：正常細胞は常染色体が 2 倍体なので、2 を掛ける

6. 常染色体数が 2 倍体でないサンプルのプロウイルスコピー数算出に関して
本セットでは、染色体上に 1 コピー数存在するヒト IFNγ領域を測定しますので、常染色体数が 2 倍体の場合 5 の計算式で最後に 2 を掛けますが、常染色体数が 2 倍体でないサンプルの正確なプロウイルスコピー数を算出することは困難です。ただ、染色体の数を予め調べておき、5 の計算式で 2 を掛ける代わりにその倍体数を掛けることで、おおよそのプロウイルスコピー数を算出することは可能と考えられます。

VII. 実験例

1. 方法
   レトロウイルスベクター―で遺伝子導入した細胞（常染色体 2 倍体細胞）をクローニングし、サザンブロッティングでプロウイルスコピー数を測定した。得られたプロウイルスコピー数が 1 コピー / 細胞～ 6 コピー / 細胞の細胞からゲノム DNA を抽出し、本セットにより、それぞれ 100 ng のゲノム DNA を用いてプロウイルスコピー数を測定し、サザンブロッティングの結果と比較した。

2. 結果
   レトロウイルス用検量線及びヒト IFNγ用検量線を図 1A、B にそれぞれ示す。
   各サンプルのプロウイルスコピー数の、本セットを用いた値とサザンブロッティングの値の比較を表 1 に示す。

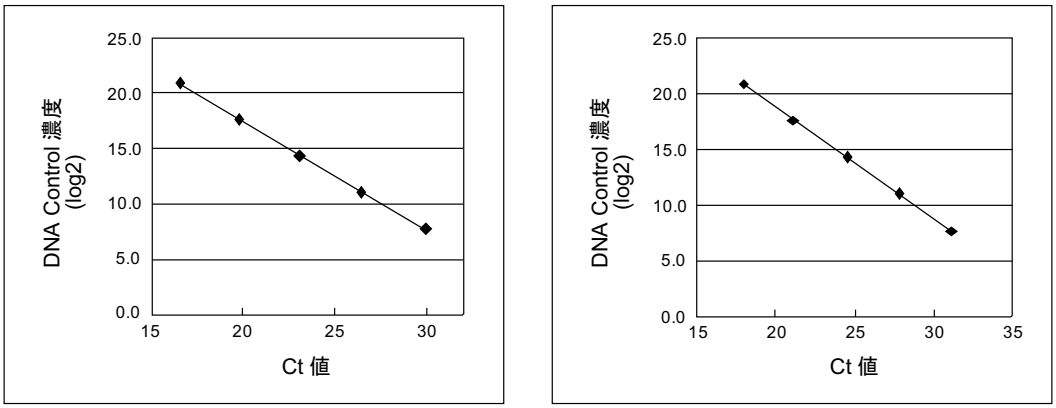


図 1. 本セットで得られた検量線
A：レトロウイルス用検量線、 B：ヒト IFNγ用検量線

表 1. 本セットを用いたプロウイルスコピー数とサザンブロッティングの結果との比較

本セットを用いて算出したプロウイルスコピー数	サザンブロッティングで得られたプロウイルスコピー数
0	0
0.93	1
2.01	2
2.88	3
3.01	3
6.25	6

VIII. 関連製品

本製品は、Cycleave®PCR Core Kit（製品コード CY501）と組み合わせてご使用ください。

リアルタイム PCR 装置
　Thermal Cycler Dice® Real Time System *III*（製品コード TP900）
8 連チューブ & キャップ
　0.2 ml Hi-8-Tube/0.2 ml Hi-8-Flat Cap（製品コード NJ300/NJ302）
レトロウィルスベクター用高効率遺伝子導入試薬
　RetroNectin®（Recombinant Human Fibronectin Fragment）(製品コード T100A/B)
レトロウイルス調製細胞
　レトロウイルス調製細胞 G3T-hi 細胞（製品コード 6163）
遺伝子導入用ガス透過性遠心バッグ
　CultiLife® Spin（製品コード KB630）
一過性レトロウイルスベクター作製キット
　Retrovirus Constructive System Eco/Ampho（製品コード 6164/6165）
レトロウイルスベクタープラスミド DNA
　pDON-AI-2 Neo DNA/pDON-AI-2 DNA（製品コード 3653/3654）
　pMEI-5 Neo DNA/pMEI-5 DNA（製品コード 3655/3656）
　pDON-5 Neo DNA/pDON-5 DNA（製品コード 3657/3658）
siRNA 発現用レトロウイルスベクタープラスミド DNA
　pSINsi-hH1 DNA/pSINsi-hU6 DNA/pSINsi-mU6 DNA（製品コード 3660/3661/3662）
レトロウイルスの力価測定試薬
　Retrovirus Titer Set（for Real Time PCR）(製品コード 6166)

IX. 注意

・本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
・ ライセンスに関する最新の情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
・ 本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

[L4] Quencher
This product is for measurement of amplification detection for research use only in life sciences research, industrial and environmental testing (including food industry, but excluding bio-terrorism and bio-warfare), non-human animal diagnostic testing, forensic testing and providing services to third parties who do not use the services for the purpose of (a) providing patient management or care, and in which the results of such services are not included in patient records and (b) providing bio-terrorism or bio-warfare testing; and specifically excluding, without limitation: (I) any human clinical, therapeutic or diagnostic uses and animal clinical and therapeutic uses (including any use of the results of any testing performed with any product for patient management or care, or the use of the results of the services for patient management or care) and (II) any research or services where the results of any test or assay are used for patient management, care or otherwise in making therapeutic or treatment decisions for a patient.
A portion of this product is subject to proprietary rights of Epoch Biosciences, Inc. and are made and sold under license from Epoch Biosciences, Inc. under the patents and patent applications (US20020155484, WO0142505, WO02099141, US10/113,445, US09/876,830 and corresponding patents issued in other countries).
There is no implied license for commercial use with respect to this product. A license must be obtained directly from Epoch Biosciences, Inc. with respect to any proposed commercial use of this product, and "commercial use" includes but is not limited to (A) the sale, lease, license or other transfer of this product or any material derived or produced from it, (B) the sale, lease, license or other grant of rights to use this product or any material derived or produced from it, and (C) the sale, lease, license or other transfer of kits which include this product.

[M46] PCR-Cycleave
This product is covered by the claims of Japanese Patent No. 4022522.

製品についての技術的なお問い合わせ先
TaKaRa テクニカルサポートライン
Tel 077-543-6116　Fax 077-543-1977
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/

タカラバイオ株式会社

v201210Da